

## **Título: Imunoterapia de Células T CAR em Neoplasias Linfoides: Aplicações e Limitações**

**Dissertação de Mestrado | Artigo de Revisão Bibliográfica**

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Medicina

Nome: Tiago André Sousa Oliveira

Classe: Aluno 6º ano profissionalizante

Afiliação: Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, da Universidade do Porto

Número institucional: 201004796

Contacto: +351919196424

Email: tiagooliveira@gmx.com

Orientadora: Dra. Cláudia Almeida Casais

Classe: Médica Assistente de Hematologia

Email: Ccasais@hotmail.com

## Resumo

**Introdução:** A Imunoterapia de Células T CAR (*Chimeric Antigen Receptor*) usa células T modificadas geneticamente que expressam recetores antigénicos específicos contra as células alvo neoplásicas. A sua aplicação demonstrou maior sucesso em neoplasias linfoides de células B, em recidiva ou refratárias a tratamento, com células T CAR anti-CD19.

**Objetivos:** Elaborar uma revisão bibliográfica dos aspetos técnicos da imunoterapia com Células T CAR, e a sua aplicabilidade, eficácia e limitações no tratamento de neoplasias linfoides, com base na informação dos artigos científicos mais recentes e relevantes.

**Métodos:** Pesquisa de artigos científicos em sites de publicação científica, nomeadamente as bases PubMed e ScienceDirect, publicados até 31 de Maio. Foi realizada uma seleção da informação dos artigos mais pertinentes e de maior rigor científico. Informação adicional relevante foi obtida de diretrizes, livros, páginas de internet e consensos.

**Resultados:** A estrutura molecular do CAR e o seu procedimento de produção evoluíram na direção de responder às causas de insucesso identificadas em estudos pré-clínicos e no contexto da aplicação clínica. A adição de um endodomínio de coestimulação parece ser um dos avanços mais significativos para garantir a persistência das células T CAR. A investigação de novos métodos de transdução não-virais, novos alvos moleculares, e processos de cultura celular e seleção fenotípica podem ser essenciais na redução dos custos da terapêutica, aumento de eficácia e automatização do procedimento.

**Conclusão:** A imunoterapia de Células T CAR é uma técnica em evolução que já comprovou o seu potencial terapêutico em vários ensaios clínicos. Estudos posteriores e a aplicação do conhecimento adquirido em protocolos clínicos são necessários para otimizar a produção, eficácia e perfil segurança da terapia.

**Palavras-chave:** Células T CAR, imunoterapia em cancro, terapia celular adotiva, neoplasias linfoides, recetores quiméricos antigénicos, cancros hematológicos, terapia genética, linfócitos T citotóxicos.

## **Abstract**

**Introduction:** CAR (Chimeric Antigen Receptor) T Cell Immunotherapy uses genetically modified T Cells that express antigen receptors specific to the neoplastic cells being targeted. Its application has shown the most success in relapsed or treatment refractory B cell lymphoid cancers, particularly with anti-CD19 CAR T cells.

**Objectives:** To design a literature review of the technical features of CAR T Cell Immunotherapy, and its applicability, efficacy and limitations in the treatment of lymphoid cancers, based in information of the most recent and relevant scientific articles.

**Methods:** Research of scientific articles in scientific publication websites, namely, PubMed and ScienceDirect, published up to May 31<sup>st</sup>. A selection of the most relevant and scientifically accurate articles was held. Important additional information was obtained from guidelines, books, web pages and consensus.

**Results:** The molecular structure of the CAR and its production procedure have evolved towards solving the causes of failure identified in pre-clinical studies and in the setting of clinical application. The addition of a costimulatory endodomain seems to have been one of the most significant advances to guarantee the persistence of CAR T Cells. The research of new non-viral transduction methods, new molecular targets, and cellular culture processes and phenotypic selection may be essential in reducing therapy costs, and increasing efficacy and automatization of the procedure.

**Conclusion:** CAR T Cell Immunotherapy is a developing technology that has proved its therapeutic potential in various clinical trials. Further studies are needed in order to optimize the production, efficacy and safety profile of CAR T Cells.

**Keywords:** T CAR cells, cancer immunotherapy, adoptive cellular therapy (ACT), lymphoid neoplasia, Chimeric Antigen Receptors (CAR), hematological malignancies, genetic therapy, cytotoxic T lymphocytes (CTL).

## Índice

Abreviaturas .....	5
1. Introdução .....	7
2. Neoplasias Linfoides .....	7
3. Imunoterapia de Células T CAR .....	8
3.1. Fundamento Teórico .....	8
3.2. Recetores CAR e Suas Gerações .....	9
3.3. Preparação Pré-transfusão .....	11
3.4. Produção das Células T CAR.....	11
4. Aplicação Terapêutica .....	16
5. Limitações.....	16
5.1. Toxicidade.....	17
5.2. Obstáculos Logísticos .....	20
6. Resultados Clínicos.....	21
7. Perspetivas Para o Futuro.....	24
7.1. Células T CAR Combinatórias.....	24
7.2. Eliminação Celular por “Interruptores de Segurança” (safety switches).....	25
7.3. Células Alogénicas T CAR: Terapia “Off-the-shelf” .....	25
7.4. Progresso da Investigação .....	26
8. Conclusão .....	26
9. Referências Bibliográficas .....	29

## Abreviaturas

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ALL – Leucemia Linfoblástica Aguda (*Acute Lymphoblastic Leukemia*)

APC – Célula Apresentadora de Antígeno (*Antigen Presenting Cell*)

aAPC - Célula Apresentadora de Antígeno Artificial (*Artificial Antigen Presenting Cell*)

ARN – Ácido ribonucleico

CAR – Recetor Antigénico Quimérico (*Chimeric Antigen Receptor*)

CD – Cluster de diferenciação (*Cluster of Differentiation*)

CLL – Leucemia Linfocítica Crónica (*Chronic Lymphocytic Leukemia*)

EMA – Agência Europeia de Medicamentos (*European Medicines Agency*)

FcγR – Recetores Fc-gama (*Fragment, crystallizable-gamma receptor*)

GvHD – Doença de Enxerto-versus-Hospedeiro (*Graft-versus-Host Disease*)

GvT – Efeito de Enxerto-versus-Tumor (*Graft-versus-Tumor Effect*)

HAMA – Anticorpos Humanos Anti-Murganho (*Human Anti-Mouse Antibody*)

HSCT - Transplante de Células Progenitoras Hematopoiéticas (*Hematopoietic stem cell transplantation*)

HvGR – Reação Hospedeiro-versus-Enxerto (*Host-versus-Graft-Reaction*)

LH – Linfoma de Hodgkin

LNH – Linfoma Não-Hodgkin

IFN-γ – Interferão Gama

IG - Imunoglobulina

IL – Interleucina

mAb – Anticorpo Monoclonal (*Monoclonal Antibody*)

MM – Mieloma Múltiplo

PB – sistema de transposição *PiggyBac*

PBMC – Células Mononucleares do Sangue Periférico (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*)

ROR1 – *Receptor Tyrosine Kinase-Like Orphan Receptor-1*

SB – sistema de transposição *Sleeping Beauty*

SLC – Síndrome de Libertação de Citocinas

SLT – Síndrome de Lise Tumoral

T<sub>CM</sub> – células T de memória central

TCR – Recetor de célula T (*T Cell Receptor*)

T<sub>E</sub> – células T efetoras

T<sub>EM</sub> – células T de memória efetoras

TLS – Síndrome de Lise Tumoral (*Tumoral Lysis Syndrome*)

T<sub>N</sub> – células T naïve

TNF – Fator de Necrose Tumoral (*Tumoral Necrosis Factor*)

T<sub>SCM</sub> – células T de memória estaminais

Treg – células T reguladoras

## 1. Introdução

As neoplasias linfoides compõem uma das áreas de Oncologia com maiores avanços terapêuticos e de prognóstico nas últimas décadas. Porém, caso a terapêutica inicial seja ineficaz ou ocorra recidiva da doença, as opções restantes condicionam um prognóstico praticamente terminal. Mesmo quando o transplante de células progenitoras hematopoéticas (HSCT) alogénicas é uma opção, este comporta alto risco e aplicabilidade limitada, tanto pela disponibilidade de doador compatível, como pelo estado funcional do recetor.

Tendo em consideração este enquadramento clínico, um novo tipo de imunoterapia celular, baseado na construção celular de Eshhar<sup>1</sup>, tem mostrado aplicabilidade em neoplasias linfoides de células B. Provendo células T com recetores antigénicos quiméricos (*Chimeric Antigen Receptors* - CAR) com especificidade tumoral, são produzidas células com a especificidade de um anticorpo associado à citotoxicidade e memória imunológica de uma célula T<sup>2</sup>. Esta imunoterapia vem assim colmatar uma necessidade não-correspondida (*unmet need*) comum nas neoplasias linfoides B recidivadas ou refratárias.

Ensaio clínico com células T CAR anti-CD19, uma glicoproteína presente em 95% das neoplasias de células B<sup>3</sup>, têm sido bem sucedidos desde 2010<sup>4</sup>. O potencial desta terapêutica não passou ao lado da agência FDA (*Food and Drug Administration*) dos EUA, que a concedeu em 2013 o estatuto de Terapia Inovadora (*Breakthrough Therapy*)<sup>5</sup>.

Como resultado dos estudos crescentes, a técnica evoluiu com o desenvolvimento de novas gerações e metodologias, dotadas de maior eficácia e de menores efeitos adversos, custos e tempo de produção. Agora que este tipo de imunoterapia se aproxima da aplicabilidade clínica, é prioritário discutir se terá lugar no arsenal da terapêutica oncológica.

Com esta revisão sistemática, pretendo expor a informação atualizada necessária à compreensão e análise refletiva sobre o estado de processo da técnica e fazer uma previsão dos futuros desafios e evolução a que estará sujeita.

## 2. Neoplasias Linfoides

As neoplasias linfoides compreendem patologias oncológicas heterogêneas que têm em comum a origem em células de linhagem linfóide, como células B, T, NK e plasmáticas. Um artigo relata 10.908 registos desta patologia em Portugal entre 2000 a

2007, com taxas de sobrevivência aos 5 anos desde 78,5% em Linfoma de Hodgkin (LH), até tão reduzidas como 34,9% em Leucemia/Linfoma Linfoblástico de Células Precursoras<sup>6</sup>. Estas taxas sofrem um decréscimo abrupto após recaída em Leucemia Linfoblástica Aguda (ALL), com valores de 7-10% em adultos e cerca de 30% em idade pediátrica<sup>7-9</sup>.

O tratamento da maior parte destas neoplasias envolve quimioterapia, radioterapia, terapia molecular e/ou HSCT. A sua eficácia é infelizmente insatisfatória, e apesar do intuito curativo da HSCT, a mortalidade não associada a recidiva é de 15-50%, com desenvolvimento de Doença de Enxerto-versus-Hospedeiro (GvHD) em 50%. A morbilidade induzida e os custos elevados, particularmente quando incluídos novas terapias moleculares, são ainda inconvenientes incontornáveis destas terapias.

A imunoterapia com células T CAR ambiciona assim proporcionar uma opção terapêutica nos casos em que o tratamento paliativo seria a única opção preconizada.

As leucemias B são especialmente adequadas a esta terapia, visto a sua massa tumoral exercer menor inibição por microambiente tumoral que tumores sólidos, como linfomas<sup>10</sup>, e é, em geral, acessível a células T CAR<sup>11</sup>, nomeadamente se os mecanismos de *homing* estiverem preservados.

Presentemente, a imunoterapia celular está reservada para recorrências de neoplasias de células B em que as opções terapêuticas foram esgotadas ou inspiram um prognóstico de doença terminal, e apenas sob contexto de ensaios clínicos. A exclusão atual das neoplasias de células T, NK ou plasmáticas, é justificada pela dificuldade em identificar marcadores antigénicos com perfil de expressão seguro, isto é, com alvos antigénicos acessíveis e de expressão transversal nas células neoplásicas, mas ausentes em tecidos essenciais<sup>12</sup>. Para as neoplasias T, existe ainda o inconveniente de a aplasia T não ser satisfatoriamente tratável como a aplasia de células B<sup>11</sup>.

### **3. Imunoterapia de Células T CAR**

#### **3.1. Fundamento Teórico**

A eliminação fisiológica de células transformadas é garantida pela vigilância imunitária mediada primariamente por células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas e células NK. Contudo, células cancerígenas podem eventualmente evadir o reconhecimento celular e progredir para cancro. A apresentação de antígenos pouco imunogénicos ou em número reduzido,



a diminuição de expressão de MHC-I<sup>13, 14</sup>, e um microambiente tumoral imunossupressor são alguns dos mecanismos associados ao insucesso na eliminação do tumor<sup>15</sup>.

As células T CAR são células T modificadas para expressar recetores antigénicos quiméricos (CAR) com afinidade para um alvo molecular específico. O seu uso pretende colmatar a ineficácia imunitária ao assegurar um reconhecimento antigénico independente de apresentação por HLA<sup>16</sup> e associado a uma resposta citotóxica intensa. Permite, além disso, ultrapassar a tolerância das células T (anergia) devido à inclusão de mecanismos de coestimulação intrínseca, inclusive para antigénios partilhados com tecidos saudáveis (e.g., CD19 de células B); é menos vulnerável a efeitos de imunossupressão do microambiente<sup>10</sup>; e é capaz de identificar alvos moleculares não-polipeptídicos, como carboidratos e glicolípidos<sup>17</sup>.

### 3.2 Recetores CAR e Suas Gerações

A estrutura genérica de um CAR é modular e engloba 4 componentes: um ectodomínio de reconhecimento antigénico; um espaçador extracelular; um elemento transmembranar; e um endodomínio de sinalização<sup>18</sup>.

O **ectodomínio** é geralmente composto por um fragmento variável de cadeia única derivado de um anticorpo monoclonal (scFv), que determina a especificidade antigénica<sup>1</sup>. O antigénio ideal deveria ser expresso apenas no cancro ou células prescindíveis, não ser libertado na circulação, e ser essencial ao crescimento ou sobrevivência tumoral de modo a ter expressão celular universal para que não ocorra pressão seletiva<sup>19</sup>. Alvos moleculares com estas características são invulgares.

A especificidade dos ectodomínios para neoplasias linfoides têm verificado maior investigação e sucesso contra a molécula CD19. A justificação para este interesse deve-se à sua expressão transversal nas células neoplásicas B e B progenitoras, mas não nas células progenitoras estaminais<sup>3</sup>, e à sua toxicidade associada, a aplasia de células B<sup>20</sup>, ser tolerável e tratável. Outro alvo antigénico testado clinicamente é o CD20<sup>21-23</sup>, expresso desde o estadió de célula pré-B e em mais de 90% dos linfomas de células B<sup>24</sup>, e o CD30, expresso principalmente em células de Reed-Sternberg em LH e em Linfomas Anaplásticos de Grandes Células<sup>25</sup>.

A cadeia leve  $\kappa$ , devido a exibir restrição clonal tal como várias neoplasias B, permite eliminar a subpopulação  $\kappa$ , com a neoplasia incluída, preservando a subpopulação  $\lambda^+$  saudável restante<sup>26</sup>. Disfunção imunológica resultante não é prevista, e o potencial terapêutico foi testado em um ensaio clínico de fase I com resultados promissores<sup>27</sup>.

Outros alvos potenciais a avaliar incluem o ROR1, expresso em células B neoplásicas mas não em células B normais<sup>28, 29</sup>; o CD70<sup>30</sup>, expresso em várias neoplasias linfoides e tumores sólidos; e o CD23, expresso na Leucemia Linfocítica Crônica (CLL)<sup>31</sup>.

O **espaçador extracelular** dá a distância da membrana e a mobilidade requeridas para adotar a orientação correta à ligação, e é vulgarmente derivado de moléculas de IgG, CD8 $\alpha$ <sup>32, 33</sup> ou CD28<sup>34, 35</sup>. O seu comprimento ideal varia consoante o alvo antigénico, provando ser essenciais na ligação a epítomos que se encontram justapostos à membrana da célula-alvo<sup>36</sup> ou quando o antígeno é complexo em conformação e glicosilação, como o MUC1<sup>37</sup>.

Primordialmente, os **espaçadores** eram derivados de recetores IgG1, cuja região Fc era reconhecida pelos recetores Fc-gama (Fc $\gamma$ R) dos monócitos e células NK<sup>38</sup>. Esta interação condicionava ativação ineficaz e morte induzida das células T CAR, limitando a sua persistência e eficiência<sup>38-40</sup>. Atualmente, existem domínios com Fc modificados, sem este inconveniente, como o Fc $\Delta$ <sup>38</sup>. (Este domínio pode ainda ser usado na deteção da expressão do CAR e seleção de células em cultura.)

O **domínio transmembranar**, é usualmente derivado de moléculas CD4<sup>41</sup>, CD8 ou CD28<sup>10, 40</sup>. Tal como o espaçador extracelular, tem um papel maioritariamente estrutural e de estabilidade, embora se verifique que os domínios transmembranares de CD3 $\zeta$  em T CARs de 1<sup>o</sup> geração são menos estáveis que os derivados de CD28 da 2<sup>o</sup> geração<sup>10</sup>. O seu impacto na transdução de sinal encontra-se significativamente sub-explorado em relação a outros elementos.

O **endodomínio de sinalização** é o componente que sofreu maior evolução e que define a geração do CAR.

A **primeira geração** é caracterizada por um único endodomínio de sinalização tradicionalmente derivado do componente CD3 $\zeta$  do complexo do recetor da célula T (TCR)<sup>41, 42</sup>. Este é capaz de ativar mecanismos de citotoxicidade anti-tumoral intensa de curta duração, da célula T. Porém, como a maioria das neoplasias de células B não expressam domínios co-estimuladores<sup>43, 44</sup>, esta atividade é limitada pela indução de anergia<sup>45, 46</sup>, não ocorrendo proliferação sustentada das células ou ativação de células naïve<sup>46</sup>, independentemente do ectodomínio usado<sup>47-49</sup>.

A **segunda geração** aborda este obstáculo ao incorporar um domínio intracelular coestimulador entre o domínio transmembranar e o componente CD3 $\zeta$ . Este domínio transmite um sinal coestimulador (sinal 2) que se traduz numa resposta celular intensificada com maior proliferação, maior libertação de citocinas como IL-2, e taxas de apoptose induzida pós-ativação reduzidas<sup>50-52</sup>, aumentando a persistência das células in

vivo e evitando recorrências<sup>53, 54</sup>. Endodomínios de coestimulação baseados em CD28 provaram ser particularmente eficazes<sup>53-56</sup>, mas outras moléculas coestimulatórias como 4-1BB (CD137)<sup>33, 49, 57, 58</sup>, CD27<sup>34, 59</sup>, DAP<sup>51, 60</sup>, OX-40 (CD134)<sup>45, 61</sup> e ICOS (CD278)<sup>45, 62</sup> têm sido estudadas com resultados variados.

A **terceira geração** adiciona ainda outro domínio coestimulador em série ao anterior, o que amplia ainda mais a resposta celular<sup>35, 48</sup>.

### **3.3      *Preparação Pré-transfusão***

A proliferação e persistência das células T CAR é influenciada por fatores do recetor pré-transfusão, como a homeostasia linfóide, de modo que regimes de condicionamento são usualmente aplicados.

A imunodepressão prova ser benéfica para a proliferação, persistência e atividade anti-tumoral das células T CAR *in vivo*<sup>17, 63</sup>. As justificações propostas são: que a linfodepleção reduz o número de células T reguladoras (Treg) em circulação, que se presentes iriam inibir a atividade anti-tumoral das células T CAR<sup>64</sup>; a diminuição de células linfóides altera a homeostasia celular linfocítica e diminui a competição por citocinas como IL-7 e IL-15 pelas células T CAR transfundidas, que promovem assim a sua proliferação e atividade anti-tumoral<sup>65</sup>.

Os resultados de ensaios clínicos têm verificado que na ausência de pré-condicionamento, a persistência das células T CAR e a resposta tumoral não foram tão significativas<sup>54, 66</sup> como quando imunodepressão é realizada previamente<sup>66-68</sup>. Segundo uma meta-análise recente de ensaios clínicos de fase I com CARs anti-CD19, a sobrevida livre de doença aos 6 meses com imunodepleção prévia chegou até 94,6%, enquanto que sem esta, foi de apenas 54,5%<sup>69</sup>. Quimioterapia ou terapia molecular podem ainda ser usadas com este intuito, de modo semelhante ao preconizado para um HSCT.

Devido ao prolongado tempo de produção das células T CAR, usualmente regimes de quimioterapia são continuados ou instituídos nesse período para controlo da doença e/ou redução da massa tumoral<sup>21</sup>. Um regime de linfodepleção curto pode também ser administrado dias antes da transfusão<sup>22</sup>.

O uso complementar de citocinas como a interleucina (IL) 7<sup>70, 71</sup> e IL-15<sup>72</sup> parece ainda suportar a expansão dos linfócitos T CAR intra-hospedeiro.

### **3.4      *Produção das Células T CAR***

A produção de células T CAR segue os seguintes passos gerais<sup>73</sup>:

1. Leucaférese de Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC), com isolamento da população T;
2. Ativação celular e proliferação das células T;
3. Transferência genética da cassete CAR;
4. Expansão, ativação e seleção celular ex-vivo;
5. Acondicionamento e administração.

A leucaférese permite obter PBMCs, usando separadores automáticos ou classicamente por gradiente de centrifugação Ficoll-Paque<sup>74</sup>. Estas células são submetidas a processos de isolamento de células T, com verificação posterior da pureza do produto celular por citometria de fluxo<sup>75</sup>. A ativação celular que se segue, garante a expansão do número de células T para números terapêuticos antes da transferência genética da cassete CAR. Uma nova expansão pós-transdução é ainda realizada de modo a garantir a ativação celular antes da administração.

Alguns dos passos mais críticos da produção são a seguir abordados.

### **Transferência Genética da Cassete CAR**

A transferência e tradução da sequência genética que codifica o CAR pode ser conseguida por diferentes técnicas: por transdução viral ou por sistemas não-virais, que garantem uma expressão do CAR permanente; ou por introdução de segmentos de mRNA transcritos em vitro, com expressão celular transitória.

A **transdução viral** baseia-se no uso de transposições de classe I<sup>76</sup>, em que vírus modificados de ARN são usados como vetores que libertam os transgenes CAR no citoplasma das células T. Estes são transcritos para ADN por uma transcriptase reversa viral, e o segmento de ADN produzido é inserido no genoma por uma integrase viral. Dentro dos vetores virais usados, vírus dos géneros Gamaretrovirus e Lentivirus são particularmente populares, nomeadamente o Vírus da Leucemia Murina (VLM) e o Vírus da Imunodeficiência Humana tipo I (VIH-1), respetivamente<sup>77, 78</sup>.

Os métodos virais têm desvantagens significativas que limitam a sua aplicação clínica: são atualmente caros e lentos para produzir em grandes quantidades necessárias para efeitos de imunoterapia<sup>79</sup>; têm riscos de contaminação por espécies competentes

dos vírus usados e de recombinação vírica, que exigem testes de detecção extensos<sup>80</sup>; e podem desencadear uma resposta imunológica nefasta<sup>81</sup>.

A **transdução não-viral** usa transposições de classe II<sup>76</sup>, baseados em plasmídeos de ADN. Dois plasmídeos são inseridos na célula habitualmente por electroporação (aumento transitório da permeabilidade membranar com corrente elétrica)<sup>82</sup>: um dos plasmídeos codifica uma transposase que após tradução insere o transgene do segundo plasmídeo no genoma da célula. Os sistemas atualmente utilizados são o *Sleeping Beauty* (SB)<sup>79, 83</sup> e o *PiggyBac* (PB)<sup>84</sup>.

O método não-viral apresenta vantagens relevantes: o seu processo de produção e controlo de qualidade para múltiplos pacientes é mais simples, mais seguro e menos caro que o uso de vírus<sup>75</sup>; em contraste com a preferência de posição de inserção genómica de alguns vírus, em ou próximo de proto-oncogenes com um risco mutagénico subjacente, os transposições SB e PB têm pouca ou nenhuma preferência posicional relevante identificada<sup>85, 86</sup>; e a transfecção por métodos não-virais não exige ativação prévia das células, diminuindo o tempo de cultura e as alterações fenotípicas e funcionais associadas à ativação.

Outro método não-viral, é a **transfecção de plasmídeos de RNA mensageiro** (mRNA). Através de electroporação, estes são introduzidos nas células T que expressarão temporariamente (de dias a semanas)<sup>87</sup> os CAR codificados nesses transgenes.

As vantagens desta última técnica incluem: a capacidade de expressão transitória do CAR em células T; não acarretar risco de genotoxicidade a longo-prazo devido à sua natureza não-insercional<sup>88</sup>; e a simplicidade, eficiência de transfecção e viabilidade celular superiores aos outros métodos não-virais<sup>89</sup>. Pode ser particularmente útil para avaliar as características da especificidade antigénica manifestadas precocemente, como o efeito anti-tumoral e padrões de toxicidade ao alvo extra-tumor, ou eventualmente num contexto terapêutico com administrações sequenciais de células T CAR<sup>90</sup>.

### **Controlo de Qualidade e Segurança**

Os sistemas de cultura celular têm de garantir a disponibilização de nutrientes, oxigénio e dissipação de resíduos metabólicos, que determinam as suas grandes dimensões para garantir uma área de superfície adequada à difusão de gases. Nos últimos anos têm-se evoluído de sistemas abertos, como placas e frascos de cultura,

para sistemas semi-fechados, como sacos de cultura de tecidos, ou fechados, como biorreactores de tanque com agitação. Os sistemas semi-fechados e fechados apresentam as vantagens de menor risco potencial de contaminação<sup>91, 92</sup> e maior eficiência de área usada, com menores custos relacionados ao espaço ocupado<sup>93</sup>.

Testes de esterilidade são realizados para garantir a exclusão de contaminações do meio, ou no produto final ou no produto intermédio até 48-72h antes da administração<sup>94</sup>. Tanto a FDA<sup>94</sup> como a Agência Europeia de Medicamentos (EMA)<sup>95</sup> concordam que a esterilidade deve incluir a detecção negativa de *Mycoplasma*, culturas fúngicas e bacterianas negativas, e o nível de endotoxina detetado inferior a 5EU/kg do recetor<sup>96</sup>.

A citotoxicidade das células T obtidas é avaliada classicamente por um ensaio de libertação de crómio-51 (<sup>51</sup>Cr), ou alternativamente por um ensaio de citometria de fluxo ou por um ensaio de biolumiscência. No primeiro ensaio, células-alvo são incubadas num meio rico em Cr<sup>51</sup> que estas incorporam, sendo posteriormente inoculado com células T CAR. A radioatividade medida no supernadante do meio será proporcional ao crómio libertado na lise das células-alvo, permitindo estimar o nível de citotoxicidade das células T.

### **Seleção Fenotípica Ex-vivo**

O procedimento de produção celular pode utilizar células T policlonais não-selecionadas por subtipo, com distribuição fenotípica própria do dador e à posterior estimulação em cultura ex-vivo. Esta amostra incluirá células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, cuja ação combinada parece ser superior à ação isolada de células CD8<sup>+</sup><sup>97</sup>. De modo a reduzir o número de células indesejadas e a competição por nutrientes e vetores de transdução, pode ainda ser realizada uma seleção negativa. Em pacientes com neoplasias de células B, estas podem ser removidas associadas a esferas paramagnéticas anti-CD19, num processo análogo a uma “centrifugação magnética”<sup>75 98</sup>. A seleção positiva de subpopulações T, como CD27<sup>+</sup>, associada a imaturidade e sobrevivência celulares aumentadas<sup>34, 99</sup>, e redução do tempo de cultura<sup>100</sup>, é uma área em desenvolvimento.

Recentemente, tem-se verificado que células T CD62L<sup>+</sup> naïve [T<sub>N</sub>] indiferenciadas apresentam maior resposta terapêutica e proliferativa após transdução<sup>101</sup>, e são dotadas de telómeros longos, associados a menor senescência replicativa<sup>100, 102</sup>. Esta subpopulação pode potencialmente ser selecionada pré-cultura e submetida a proliferação e diferenciação seletiva otimizada em subpopulações mais desejáveis, pela opção de interleucinas e estímulos ex-vivo.

Nos primeiros ensaios, IL-2 e anticorpos monoclonais anti-CD3 (Muromonab-CD3)<sup>103</sup> e anti-CD28 eram usados em cultura para induzir a proliferação e diferenciação celular em células T CD62L<sup>-</sup> efetoras [T<sub>E</sub>] e T CD62L<sup>-</sup> de memória efetoras [T<sub>EM</sub>]<sup>104 105</sup>, com a desvantagem de estas terem persistência reduzida, apesar de citotoxicidade elevada<sup>106</sup>. Atualmente, estudos indicam que citocinas como IL-15 e IL-7 em baixas doses induzem proliferação com menor diferenciação, associadas a maior persistência<sup>107</sup> e eficácia anti-tumoral resultantes<sup>106</sup>, presumivelmente justificadas por maior proporção de células T CD62L<sup>+</sup> de memória central [T<sub>CM</sub>] e T CD62L<sup>+</sup> CD95<sup>+</sup> de memória estaminais [T<sub>SCM</sub>]<sup>101, 107</sup>. Em particular, IL-15 revela induzir proliferação de células T<sub>EM</sub> e T<sub>SCM</sub>, com reduzida resposta por parte das T<sub>E</sub><sup>108, 109</sup> e permanência de expressão de CD62L, necessário para o homing para órgãos linfáticos secundários onde as células T CAR são submetidas a coestimulação adicional pelas Células Apresentadoras de Antígeno (APC)<sup>106</sup>. A IL-7 mostra-se igualmente útil na manutenção de fenótipos com menor diferenciação, como T<sub>SCM</sub><sup>101</sup>.

Quanto aos anticorpos monoclonais solúveis, têm vindo a ser substituídos por esferas paramagnéticas (*paramagnetic beads*) anti-CD3/anti-CD28, que mimetizam a estimulação fisiológica de APCs, com estimulação superior<sup>105</sup>. Como vantagem adicional, permitem realizar a separação positiva das células adsorvidas num processo análogo a uma “centrifugação magnética”, com pouco stress mecânico, baixo custo e alta automaticidade<sup>110</sup>. O estímulo CD3 e CD28 causa a expansão das células T para o número desejado e garante que estas se encontram em divisão e, logo, suscetíveis a transdução viral posterior<sup>111</sup>. Após a transdução, os mesmos estímulos garantem a ativação celular necessária para a persistência celular.

Opcionalmente, APCs podem ser empregadas com outros métodos de ativação celular, como IL-2. As APCs podem ser classificadas como APCs autólogas ou APCs artificiais (aAPCs) alogénicas, e como antígeno-específicas ou não-antígeno-específicas, consoante a expressão de ligandos específicos para os ectodomínios CAR ou outros ligandos, respetivamente. As APCs autólogas compreendem as células dendríticas e células B neoplásicas ou ativadas por CD40<sup>75, 112</sup>, cujo comportamento variável e preparação complexa e custosa limitam o seu uso. Por sua vez, os aAPCs alogénicas incluem as células tumorais irradiadas K562<sup>113-117</sup>, células da linha Nalm-6<sup>75</sup>, e células de Raji<sup>66, 113</sup> que são uma opção eficaz e popular *off-the-shelf* com capacidade de autorrenovação, comportamento previsível, e menor custo e tempo de procedimento<sup>83, 115</sup>. Estas células podem ainda ser geneticamente modificadas de modo semelhante às células T CAR, de modo a expressar o antígeno específico dos CAR em produção<sup>118</sup>.

### **Acondicionamento e Administração**

Após a conclusão do protocolo, as células obtidas deverão ser transfundidas no prazo de 72h. Caso tal não seja possível, habitualmente por estado incompatível do paciente ou distância ao laboratório, as células devem ser criopreservadas até um máximo de 21 dias<sup>119</sup>. A criopreservação diminui as restrições de tempo para testar a eficácia e segurança do produto celular<sup>74</sup>, assim como permite a realização de várias transfusões a partir do mesmo lote original<sup>120</sup>.

O número ideal de células T é difícil de estimar devido ao alto potencial replicativo in vivo, com fraca correspondência entre células transfundidas e células que persistem<sup>121</sup>. A maior parte dos estudos considera um nível máximo seguro de cerca de  $3 \times 10^6$  células/kg<sup>122-124</sup>. Após ser atingida a quantidade desejada de células, estas são lavadas, suspensas em soro fisiológico e transfundidas por um acesso venoso periférico<sup>125, 126</sup>.

### **4. Aplicação Terapêutica**

A imunoterapia de células T CAR está reservada para neoplasias de células B recidivantes ou refratárias a quimioterapia, ou eventualmente, em doença estável com alto risco de recidiva. Nestes casos, o transplante de células hematopoiéticas alogénico é frequentemente uma das últimas opções com potencial curativo. Como tal, a Imunoterapia T CAR pode ser uma ponte terapêutica que permita a indução de resposta completa antes do transplante de células progenitoras hematopoiéticas alogénico<sup>127</sup>. A realização de transplante primeiro, com administração de células T CAR posterior é igualmente praticável. Esta última abordagem procura associar o efeito terapêutico da reação de enxerto-versus-tumor (GvT) à citotoxicidade específica das células T CAR. Os resultados deste procedimento foram averiguados em dois ensaios clínicos com resultados positivos<sup>114, 118</sup>, sem registo de reação de enxerto-versus-hospedeiro (GvH).

### **5. Limitações**

Apesar do avanço significativo da Imunoterapia celular, novos desafios emergem à medida que esta técnica passa à fase de ensaio clínico e padrões previamente desconhecidos de toxicidade e insucesso são caracterizados.



## **5.1 Toxicidade**

Quanto à toxicidade, pode simplisticamente ser dividida em 7 tipos principais.

### **Genotoxicidade do Sistema de Transdução**

A toxicidade do sistema de introdução de genes deve-se ao potencial de mutagénese insercional por integração de transgenes próximo de proto-oncogenes, com ativação destes e transformação maligna<sup>86, 128</sup>. Contudo, este risco é reduzido com o uso de cassetes genéticas CAR com promotores fisiológicos humanos, com melhor perfil de segurança em relação aos amplificadores virais<sup>129, 130</sup>.

Este efeito adverso foi verificado em células estaminais hematopoiéticas<sup>131, 132</sup>, mas atualmente é apenas hipotético para células T periféricas<sup>133-138</sup>. Tal pode justificar-se por se tratarem de células diferenciadas com menos vias de desenvolvimento ativas<sup>10</sup>, devido à natureza dos transgenes envolvidos<sup>139</sup>, ou devido à terapia genética que usa estas distintas populações celulares ter objetivos e usar transgenes diferentes.

Para métodos não-virais, os riscos associados a genotoxicidade têm sido extensamente negados através do estabelecimento de medidas de segurança procedimentais<sup>140, 141</sup>.

### **Toxicidade Sistémica (“on target, on tumor”)**

Em cerca de dois terços dos pacientes pode desenvolver-se uma reação inflamatória sistémica denominada de Síndrome de Libertação de Citocinas (SLC). Esta é uma consequência da ativação e proliferação intensas de células T CAR após contacto antigénico, com libertação em massa de citocinas, particularmente Interferon Gama (IFN- $\gamma$ ) e IL-6, e Fator de Necrose Tumoral (TNF) em menor grau<sup>142</sup>. A sua apresentação clínica pode variar de leve e auto-limitada com febre alta e mialgias, até grave e potencialmente fatal com aumento da permeabilidade vascular, hipotensão arterial, citopenias, coagulopatia, e disfunção multi-orgânica, culminando em choque e morte<sup>142</sup>. Alterações analíticas são frequentes e revelam a natureza inflamatória da reação, como níveis elevados de proteína C-reativa (PCR) e ferritina<sup>143, 144</sup>. A instalação dos sintomas pode dar-se em algumas horas<sup>66, 145</sup> até cerca de 6-20 dias<sup>67, 142</sup> após a infusão das células T CAR, dependendo da sua engenharia co-estimulatória<sup>139, 143</sup> e com instalação mais célere para reações graves<sup>143</sup>. Quanto à intensidade da reação, mostrou-se haver

relação entre a massa tumoral e a intensidade da libertação das citocinas inflamatórias envolvidas<sup>68, 146</sup>.

A libertação de IFN- $\gamma$  parece ser dependente da ação das células T CAR, enquanto o **Síndrome de Ativação Macrofágica (SAM)** associado que se desenvolve por ativação secundária anormal dos macrófagos, parece estar associado a aumentos de IL-6<sup>147</sup>. Este síndrome tem apresentação semelhante ao SLC e pode incluir ainda hepatosplenomegalia, características histológicas de linfocitose hemotofagocítica, níveis elevados de triglicerídeos, aminotransferases, bilirrubina (principalmente conjugada) e cadeia  $\alpha$  do IL2R solúvel e níveis reduzidos de fibrinogénio<sup>139, 143, 148</sup>.

Medidas de profilaxia passam pela divisão da dose celular inicial em vários dias<sup>149</sup> e monitorização apertada dos parâmetros vitais nas primeiras horas, com avaliação clínica e analítica regular nos dias subsequentes para deteção precoce<sup>122</sup>. Uso de critérios diagnósticos, como os propostos por Davilla et al<sup>122</sup>, e cálculo seriado do score SOFA (*Sequential Organ Failure Assessment*)<sup>150</sup> em pacientes em estado crítico, pode ser útil na monitorização, e evidencia associação com as elevações séricas de IFN-  $\gamma$  e TNF<sup>67</sup>.

Na terapia celular anti-CD19, tanto as subpopulações CD19<sup>+</sup> cancerígenas como saudáveis causam a ativação das células CAR. Assim, uma das medidas propostas é ainda reduzir o número de células B através do uso de quimioterapia ou de terapia monoclonal, como o maB anti-CD20 rituximab<sup>67</sup>, antes da infusão de células T CARs<sup>114</sup>, o que já faz parte da terapia anti-tumoral preconizada.

Quanto a medidas terapêuticas, compreendem o internamento em unidade de cuidados intensivos e suporte<sup>122</sup> com vasopressores, ventilação mecânica, anti-epilépticos, e antipiréticos, corticosteróides em alta dose e administração de anticorpos monoclonais anti-recetor-IL6, tocilizumab<sup>148, 151, 152</sup>. Altas doses linfotóxicas de corticoides causam melhoria rápida da clínica, todavia com o custo da diminuição do número das células T CAR em circulação<sup>68, 122, 153</sup>. Tocilizumab não parece ter esse efeito, sendo atualmente o tratamento preferencial, porém o momento ideal para a sua introdução necessita de confirmação<sup>153, 154</sup>. A inclusão de genes suicida permite causar depleção seletiva das células T CAR com a administração de um fármaco inócuo, atuando como interruptores de segurança (*safety switches*), e será abordada nas “Perspetivas Para o Futuro”.

### **Síndrome de Lise Tumoral**

O Síndrome de Lise Tumoral (TLS) é secundário à lise celular tumoral intensa<sup>114, 155</sup>, comum a outras terapias oncológicas. É associado a hipercalémia, hiperfosfatémia, e hiperuricemia, e a monitorização laboratorial 2-3 vezes por semana é recomendada para

uma intervenção precoce. A abordagem terapêutica inclui fluidoterapia, alopurinol profilático, rasburicase, e eventualmente hemodiálise<sup>2</sup>.

### **Neurotoxicidade**

Outro padrão de toxicidade é a **neurotoxicidade**, que se pode apresentar com confusão e obnubilação, ou défices neurológicos como afasia, parésia facial, mioclonias, tremor, apraxia e ataxia. Kochenderfer<sup>156</sup> e Davila<sup>122</sup> observaram nos seus ensaios clínicos de CARs anti-CD19 que estas complicações não-letais se iniciavam na 1ª à 2ª semana após a infusão e que resolviam num período de 2-3 dias até um mês, com tratamento médico sintomático (antiepiléticos e corticosteroides)<sup>2</sup>, sem sequelas. Embora os mecanismos fisiopatológicos subjacentes ainda não sejam claros<sup>122</sup>, visto o SNC não expressar CD19<sup>156, 157</sup> e as células T CAR não serem detetáveis sistematicamente no LCR<sup>122, 156</sup>, presume-se que esta toxicidade não seja mediada diretamente pelas células T CAR.

### **Toxicidade ao Alvo, Extra-tumor (“on target, off-tumour”)**

Visto os CAR não terem reconhecimento antigénico restrito a HLA, estes podem reconhecer um antígeno sem distinguir se a célula é neoplásica ou saudável, induzindo morte celular indiscriminada das duas populações enquanto persistirem. Este fenómeno, característico da terapia celular anti-CD19 e anti-CD20<sup>158</sup>, conduz aos efeitos adversos de aplasia de células B<sup>126, 155</sup> e hipogamaglobulinemia<sup>66, 67, 155</sup>, condições que parecem ser indicadores positivos da ação sustentada das células T CAR<sup>4, 67, 155</sup>. O tratamento da aplasia B e hipogamaglobulinemia é a administração de IGGs<sup>143, 144, 155</sup>, mas a persistência destes estados pode condicionar na mesma um aumento do risco de infeções.

### **Toxicidade ao Alvo, Extra-tecido (“on target, off-organ”)**

O alvo antigénico dos CAR pode não ser exclusivo às células tumorais e ter expressão celular em diferentes tecidos saudáveis. Assim, também estes tecidos serão atacados no que é descrita como toxicidade ao alvo, extra-tecido (*on target, off organ*). Esta toxicidade não se tem verificado para as neoplasias linfoides, mas existem vários relatos extensos para outras neoplasias<sup>125, 159</sup>.

### **Reação Alérgica**

O desenvolvimento de uma reação anafilática é raro mas possível, visto o ectodomínio scFv ter potencial imunogénico em transfusões celulares repetidas, devido a ser derivado de murganho<sup>160</sup>. Suspeita-se que efeitos menos evidentes de rejeição imunitária sejam mais prevalentes e incluam a diminuição da eficácia da imunoterapia celular pela produção de anticorpos humanos anti-anticorpos de murganho (*Human Anti-Mouse Antibodies* - HAMA)<sup>127, 161, 162</sup>.

Ambos os efeitos adversos mencionados podem ser evitáveis com o uso de CARs modificados ou totalmente humanos<sup>161, 163</sup> e/ou regiões dobradiça mais curtas, que possuem menor imunogenicidade.

## **5.2 Obstáculos Logísticos**

Dificuldades logísticas à investigação incluem: preocupações quanto a proteção de propriedade intelectual, que complicam o estabelecimento de potenciais cooperações entre instituições<sup>164</sup>, mas que poderão ser superadas caso sejam condição imposta pelas entidades financiadoras; a investigação não ser uniforme, devido a diferentes investigadores estudarem frequentemente apenas uma das componentes do procedimento, por vezes sem estudos de seguimento, obtendo resultados que podem não ter aplicabilidade quando combinados com os conhecimentos obtidos de outros estudos; dificuldade pela indústria farmacêutica em fazer um investimento avultado, apenas acessível a grandes companhias ou grupos, numa técnica com risco significativo de insucesso comercial comparativamente a outros produtos mais lucrativos e de aplicações semelhantes, como terapias com anticorpos monoclonais, com redução da competitividade investigacional;

Um investimento inicial significativo seria necessário para a produção clínica em massa de células T CAR, nomeadamente em infraestruturas, equipamento e investigação. Porém, os custos por tratamento podem ser reduzidos significativamente com o desenvolvimento de sistemas de produção fechados e automatizados<sup>165</sup>, nomeadamente com o uso de transposições não-virais, podendo ser tão baixos quanto 6.000\$ por administração<sup>165</sup>, ou segundo Rosenberg<sup>164</sup>, cerca de 15.000\$ por paciente; podem potencialmente compensar a longo prazo devido a ganhos significativos nas taxas potenciais de resposta completa (*Complete Response* - CR) e sobrevivência livre de doença (*Disease Free Survival* - DFS) em relação aos tratamentos protocolados e menor custo em relação às imunoterapias crónicas atuais.

## 6. Resultados Clínicos

Devido à raridade relativa de casos de neoplasias linfoides de células B, existe muita heterogeneidade de características da patologia (e.g.: tipo de cancro, pré ou pós-HSCT e o tipo, regime quimioterapêutico) e intrínsecos (idade, capacidade funcional) aos participantes selecionados para os ensaios clínicos. Assim, a maior parte dos ensaios clínicos avalia a eficácia do procedimento segundo o CAR usado, com menor foco na doença e suas características.

### **CD19**

Quando células T CARs anti-CD19 de 2ª geração foram aplicadas a leucemias, a taxa de remissão completa foi de cerca de 83% e 27% em ALL e CLL, respetivamente<sup>166</sup><sup>69</sup>. As razões para esta diferença podem passar pela maior massa tumoral, inibição pelo microambiente,<sup>146, 167</sup> e a idade média superior em CLL em relação a ALL (61 vs 27 anos, respetivamente<sup>166</sup>), embora a relação com estes fatores não tenha sido consistente.

Um dos mais recentes resultados preliminares de um ensaio clínico de fase II ainda não publicado, declara remissões completas em 55 de 59 participantes (93%) com ALL, e com sobrevivência média de 79% aos 12 meses<sup>168</sup>.

Uma das causas de insucesso confirmada em ALL, que tornam a terapia anti-CD19 inutilizável, foi o recaída com blastos CD19<sup>-</sup><sup>124, 143, 148</sup>. Nestes casos, poder-se-ia ponderar nova terapia celular dirigida a um alvo diferente ainda expresso, como CD20.

No que diz respeito a linfomas, o marcador CD19 encontra-se ausente em LH<sup>169</sup>, mas está presente em LNH. Este último linfoma, adverso à ação celular T CAR devido aos tumores sólidos com abundante matriz extracelular e microambiente inibitório<sup>170</sup>, tem sido menos estudado com a terapia celular anti-CD19. Todavia, Kochenderfer destaca-se nesta área, e nos seus ensaios clínicos verificou: 2 respostas completas de 2 pacientes com Linfoma Folicular<sup>67</sup>; 2 estabilizações de doença, 2 respostas parciais e 2 respostas completas de um total de seis pacientes com Linfoma Difuso de Grandes Células B (DLBCL)<sup>114, 156</sup>; 3 estabilizações de doença e 1 resposta parcial de 4 pacientes com Linfoma de Células do Manto<sup>114</sup>; 2 respostas parciais de 2 pacientes com Linfoma Esplénico de Zona Marginal; e 2 respostas parciais e 2 completas de um total de 3 pacientes com Linfoma primário do Mediastino de Grandes Células B<sup>156</sup>. Globalmente, Kochenderfer atingiu respostas completas em 23,5% e parciais em 41,1% dos casos de LNH referidos.

### **CD20**

Um primeiro ensaio clínico de fase I publicado em 2010<sup>23</sup>, mostrou resultados precoces promissores, com remissões completas em três de cinco pacientes com DLBCL. Em 2014, uma taxa de resposta semelhante foi verificada para o mesmo linfoma de estadios IIIB a IVB<sup>21</sup>, em cinco dos seis participantes. Um manteve designadamente remissão completa após 14 meses, aquando da conclusão do estudo, e os restantes obtiveram remissões parciais de 6 a 10 meses, e apenas um paciente teve resposta insatisfatória. Foi demonstrado ainda que a maioria das toxicidades sistémicas, como SLC ou síndrome de lise tumoral (SLT), ocorreram para tumores *bulky* (mais de 5cm ou de 3 lesões).

Outro ensaio clínico de 2012<sup>22</sup> com três pacientes com Linfoma de Células do Manto e um com Linfoma Folicular, revelou respostas de duração superior a 10 meses, e tão elevadas até 12 anos, apesar do nível reduzido de expressão de CAR. Neste, um regime de linfodepleção com ciclofosfamida foi administrado 2 dias antes da transfusão.

Os resultados preliminares de um ensaio de fase IIa defendem a eficácia em LNH com cinco remissões completas e três parciais de um total de oito participantes, e três remissões completas e três parciais de um total de sete pacientes com Linfoma de grandes células B difuso<sup>171</sup>.

### **CD30**

Um ensaio de fase I ingressou nove participantes com neoplasias linfoides CD30<sup>+</sup> (sete com LH e dois com linfoma de grandes células anaplástico) e maioritariamente refratárias ou recidivantes a terapia monoclonal anti-CD30. Às seis semanas de seguimento, quatro revelaram doença estável, um obteve resposta completa, outro teve resposta parcial, e três tiveram progressão da doença<sup>11</sup>.

Atualmente, espera-se o resultado de dois ensaios clínicos de fase I com T CARs anti-CD30<sup>172 173</sup> e outros quatro ensaios clínicos de fase I e/ou II encontram-se em fase de recrutamento<sup>174-177</sup>.

### **Cadeia Leve K**

Em um ensaio clínico de fase I foi verificado o potencial terapêutico de células T CAR de segunda geração específicas para a cadeia-leve-K<sup>27</sup>. Dos cinco pacientes com LNH, dois atingiram remissão completa com várias transfusões, um obteve resposta parcial e um progrediu; dois pacientes com CLL não mostraram respostas tão positivas, com evidencia de progressão cerca de seis semanas pós-transfusão.

Este ensaio destaca-se ainda por incluir três participantes com Mieloma Múltiplo (MM), tendo-se verificado estabilização da sua doença por um período de 2 a 17 meses<sup>27</sup>. Em contraste com os restantes alvos de células B, a cadeia leve K pode também ser expressa por células clonais iniciadoras de MM<sup>178, 179</sup>.

## 7. Perspetivas Para o Futuro

Devido à competição apertada para desenvolver uma terapia T CAR com superior aplicabilidade, segurança e eficácia, existem várias abordagens distintas ao aperfeiçoamento da técnica.

### 7.1 Células T CAR Combinatórias

O risco de toxicidade no alvo extra-tecido da imunoterapia celular limita a sua inocuidade, tal como a disponibilidade reduzida de alvos antigénicos exclusivamente confinados às células cancerígenas limita a sua aplicabilidade. Porém, uma abordagem multi-antigénica que exigisse ou a identificação de um antigénio cancerígeno específico e um específico ao tecido-alvo para ocorrer atividade celular T CAR, ou alternativamente, uma combinação antigénica específica ao tumor de dois antigénios não-específicos a este individualmente, reduziria estes obstáculos. Partindo deste princípio, foram desenvolvidas células T CAR com reconhecimento antigénico combinatório<sup>180, 181</sup>. Estas geralmente expressam um CAR e um CCR separados com domínios de reconhecimento antigénicos distintos e capacidade de sinalização intracelular complementar (domínios co-estimulatórios em *trans*), em contraste com os CARs de terceira geração em que os dois domínios co-estimulatórios se encontram associados ao mesmo ectodomínio de um CAR (em *cis*).

Esta técnica já foi usada com a combinação de antigénios alvo ERBB2 (HER2) e MUC1 em cancro da mama<sup>180</sup>, PSMA e PSCA em cancro da próstata<sup>181</sup>, e mesotelina e recetor de  $\alpha$ -folato em cancro do ovário<sup>182</sup>, com resultados variados.

Apesar de demonstrarem ativação aumentada quando ambos os antigénios estão presentes, não foi obtida inatividade total na presença de apenas um ou nenhum dos antigénios, ocorrendo ativação parcial desde que um alvo estivesse presente. Revelou-se ainda difícil alcançar um equilíbrio entre a proporção ideal de cada recetor expresso, resultando num comportamento imprevisível e inconstante<sup>183</sup>.

O reconhecimento combinatório abre a porta para o tratamento celular de cancros sem marcadores antigénios específicos, mas com uma combinação tumoral específica de dois antigénios. De momento, esta técnica carece de investigação progressiva *in vitro* e em modelos animais, para comprovar a sua aplicabilidade.



## **7.2 Eliminação Celular por “Interruptores de Segurança” (safety switches)**

### **Genes Suicida**

Inclusão de genes suicida é uma abordagem recente para a problemática da persistência das células T CAR após o seu efeito terapêutico estar completo ou quando os efeitos secundários exigem interrupção terapêutica. Estes genes são integrados no genoma das células T CAR e quando induzidos, causam apoptose.

Uma das metodologias faz uso da timidina-cinase do vírus herpes simplex (HSV-tk), que ativa o fármaco antivírico Ganciclovir (indutor), e culmina na interrupção da síntese de DNA e morte das células em divisão<sup>139, 184</sup>. As suas desvantagens limitam a sua aplicação e incluem: imunogenicidade potencial<sup>185</sup>; lentidão da eliminação celular, que a torna inutilizável no tratamento de SLC<sup>135</sup>; e a impossibilidade de usar o fármaco antivírico para a finalidade original.

Outra opção com maior aplicação clínica, é o uso de uma proteína de fusão, a caspase 9 induzível (iCasp9), expressa como duas subunidades inativas que após dimerização por um fármaco bioinerte, o AP1903<sup>186</sup> (indutor), ativa a cascata apoptótica intrínseca<sup>75, 186, 187</sup>. O efeito dá-se em menos de uma hora, mas a apoptose está limitada a células com alta expressão de iCasp9<sup>139</sup>.

## **7.3 Células Alogénicas T CAR: Terapia “Off-the-shelf”**

A transição para aplicabilidade à escala industrial pode potencialmente ser alcançada pela produção de células T CAR alogénicas de dador comum, prontas a usar, que excluem a necessidade de terapia individualizada e com tempo de produção extenso. Com esta abordagem, os riscos de reações de enxerto-vs-recetor (GvHD) e de recetor-vs-enxerto tornam-se reais.

A reação de enxerto-vs-recetor pode ser evitado por sequestração das células T CAR nos gânglios linfáticos<sup>188</sup> ou por supressão do gene do TCR (TCR $\alpha\beta$ )<sup>189, 190</sup>. A ablação da expressão do TCR é possível através de disrupção genética por Nucleases Dedo de Zinco (ZFN), Nucleases Efetoras semelhantes a Ativadores de Transcrição (TALEN) e tecnologia CRISP/Cas9<sup>191</sup>.

A linfodepleção é proposta para evitar a reação recetor-vs-enxerto, porém esta medida afeta também a atividade das células T CAR. Surgem assim as células T CARs

multi-resistentes à terapêutica (*multi-drug resistant CAR T cells*)<sup>192</sup> que são modificadas para não serem afetadas pelos regimes quimioterapêuticos aplicados.

#### **7.4 Progresso da Investigação**

Presentemente, a imunoterapia celular já possui suporte científico suficiente para definir algumas das características mais vantajosas para uma produção rápida, eficaz e económica. Torna-se, assim, imperativo otimizar o processo, de modo a avançar nas fases clínicas e atingir o mercado durante a próxima década.

O desenvolvimento de sistemas de cultura automáticos e fechados, de transdução não-viral eficiente, e de células T CAR alogénicas, poderão ter um papel crucial neste avanço, visto terem um maior impacto na diminuição dos custos, sem afetarem negativamente a eficácia. Por sua vez, os genes suicida e um melhor controlo do SLC irão ser essenciais para reduzir a toxicidade e garantir a segurança.

Os elementos fundamentais da técnica que mais beneficiariam de investigação posterior incluem: a determinação da estrutura molecular do endodomínio com maior persistência e citotoxicidade, designadamente a vantagem ou não de endodomínios de terceira geração em contexto clínico; a proporção ideal de células T CAR *helper* e citotóxicas para garantir o maior efeito anti-tumoral; e averiguar o efeito profilático de anticorpos monoclonais anti-IL-6 na prevenção do SLC.

### **8. Conclusão**

A compreensão da ação das células T CAR e a análise dos resultados dos ensaios clínicos tornam difícil negar o seu potencial terapêutico. Estas criam novas expectativas para casos de neoplasias de células B em que as necessidades terapêuticas não são correspondidas pelas opções disponíveis (*unmet needs*). Apesar dos riscos extensivamente estudados inerentes à terapêutica, estes são controláveis e admissíveis para o benefício previsto.

Investigação progressiva continua a ser indispensável para se otimizar a eficácia da técnica, melhorar o seu padrão de segurança e reduzir os seus custos de produção, de modo a ser economicamente praticável. A sua aplicação em massa pode permanecer a anos de distância e será naturalmente limitada a centros de referência. Contudo, os

resultados são promissores e continuarão a motivar a investigação progressiva do seu papel numa abordagem terapêutica combinada em neoplasias linfoides.

## **Agradecimentos**

À minha orientadora, Dra. Cláudia Almeida Casais, agradeço sinceramente por toda a disponibilidade e tempo despendidos, pela sugestão do tema, pela instrução e pela paciência na orientação científica desta dissertação.

Aos meus pais, Fernando Porfírio da Silva Oliveira e Rosa Maria Silva Sousa Oliveira, e aos familiares e amigos que me acompanharam, agradeço o apoio constante ao longo do curso.

## 9. Referências Bibliográficas

- 1 Z. Eshhar et al., (1993), 'Specific Activation and Targeting of Cytotoxic Lymphocytes through Chimeric Single Chains Consisting of Antibody-Binding Domains and the Gamma or Zeta Subunits of the Immunoglobulin and T-Cell Receptors'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90 720-24.
- 2 M. V. Maus et al., (2016), 'Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy for the Community Oncologist'. *Oncologist*, 21 608-17.
- 3 R. H. Scheuermann et al., (1995), 'Cd19 Antigen in Leukemia and Lymphoma Diagnosis and Immunotherapy'. *Leuk Lymphoma*, 18 385-97.
- 4 J. N. Kochenderfer et al., (2010), 'Eradication of B-Lineage Cells and Regression of Lymphoma in a Patient Treated with Autologous T Cells Genetically Engineered to Recognize Cd19'. *Blood*, 116 4099-102.
- 5 Vincent Bonagura, 'Fda Recognizes Personalized Car-T Cell Therapy Ctl019 as "Breakthrough Therapy"', Clinical Immunology Society, (2014)  
<<https://www.clinimmsoc.org/about-cis/leadership/letter-from-the-website-medical-editor/car-t-cell-therapy-ctl019>> [Accessed 20-04-2016 2014].
- 6 Roberta De Angelis et al., (2015), 'Survival Variations by Country and Age for Lymphoid and Myeloid Malignancies in Europe 2000–2007: Results of Eurocare-5 Population-Based Study'. *European Journal of Cancer*, 51 2254-68.
- 7 A. K. Fielding et al., (2007), 'Outcome of 609 Adults after Relapse of Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL); an Mrc Ukall12/ECog 2993 Study'. *Blood*, 109 944-50.
- 8 R. H. Ko et al., (2010), 'Outcome of Patients Treated for Relapsed or Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia: A Therapeutic Advances in Childhood Leukemia Consortium Study'. *J Clin Oncol*, 28 648-54.
- 9 K. Nguyen et al., (2008), 'Factors Influencing Survival after Relapse from Acute Lymphoblastic Leukemia: A Children's Oncology Group Study'. *Leukemia*, 22 2142-50.
- 10 Gianpietro Dotti et al., (2014), 'Design and Development of Therapies Using Chimeric Antigen Receptor-Expressing T Cells'. *Immunological reviews*, 257 10.1111/imr.12131.
- 11 C. A. Ramos et al., (2015), 'Car-T Cell Therapy for Lymphoma'. *Annual Review of Medicine*, 67 165-83.
- 12 M. V. Maus et al., (2013), 'Zoom Zoom: Racing Cars for Multiple Myeloma'. *Clin Cancer Res*, 19 1917-9.
- 13 A. Sette et al., (2001), 'Hla Expression in Cancer: Implications for T Cell-Based Immunotherapy'. *Immunogenetics*, 53 255-63.
- 14 B. Seliger et al., (2006), 'Molecular Mechanisms of Hla Class I Antigen Abnormalities Following Viral Infection and Transformation'. *Int J Cancer*, 118 129-38.
- 15 D. Hanahan et al., (2011), 'Hallmarks of Cancer: The Next Generation'. *Cell*, 144 646-74.
- 16 Z. Eshhar et al., (2001), 'Functional Expression of Chimeric Receptor Genes in Human T Cells'. *J Immunol Methods*, 248 67-76.
- 17 Y. Zhu et al., (2015), 'Anti-Cd19 Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells for B-Cell Malignancies: A Systematic Review of Efficacy and Safety in Clinical Trials'. *Eur J Haematol*, 96 389-96.
- 18 Saar; Carl H. June Gill, (2015), 'Going Viral: Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy for Hematological Malignancies'. *Immunol Rev*, 263 68-89.
- 19 S. Maude et al., (2015), 'Current Status of Chimeric Antigen Receptor Therapy for Haematological Malignancies'. *British Journal of Haematology*.
- 20 S. Ghorashian et al., (2015), 'Cd19 Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy for Haematological Malignancies'. *Br J Haematol*, 169 463-78.

- 21 Y. Wang et al., (2014), 'Effective Response and Delayed Toxicities of Refractory Advanced Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated by Cd20-Directed Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells'. *Clin Immunol*, 155 160-75.
- 22 Brian G. Till et al., (2012), 'Cd20-Specific Adoptive Immunotherapy for Lymphoma Using a Chimeric Antigen Receptor with Both Cd28 and 4-1bb Domains: Pilot Clinical Trial Results'. *Blood*, 119 3940-50.
- 23 M. C. Jensen et al., (2010), 'Antitransgene Rejection Responses Contribute to Attenuated Persistence of Adoptively Transferred Cd20/Cd19-Specific Chimeric Antigen Receptor Redirected T Cells in Humans'. *Biol Blood Marrow Transplant*, 16 1245-56.
- 24 B. G. Till et al., (2008), 'Adoptive Immunotherapy for Indolent Non-Hodgkin Lymphoma and Mantle Cell Lymphoma Using Genetically Modified Autologous Cd20-Specific T Cells'. *Blood*, 112 2261-71.
- 25 A. Alperovich et al., (2016), 'Targeting Cd30 Using Brentuximab Vedotin in the Treatment of Hodgkin Lymphoma'. *Cancer J*, 22 23-6.
- 26 J. Vera et al., (2006), 'T Lymphocytes Redirected against the Kappa Light Chain of Human Immunoglobulin Efficiently Kill Mature B Lymphocyte-Derived Malignant Cells'. *Blood*, 108 3890-7.
- 27 Barbara Savoldo et al., (2013), 'Clinical Responses in Patients Infused with T Lymphocytes Redirected to Target K-Light Immunoglobulin Chain'. *Blood*, 122 506-06.
- 28 M. Hudecek et al., (2013), 'Receptor Affinity and Extracellular Domain Modifications Affect Tumor Recognition by Ror1-Specific Chimeric Antigen Receptor T Cells'. *Clin Cancer Res*, 19 3153-64.
- 29 D. C. Deniger et al., (2015), 'Sleeping Beauty Transposition of Chimeric Antigen Receptors Targeting Receptor Tyrosine Kinase-Like Orphan Receptor-1 (Ror1) into Diverse Memory T-Cell Populations'. *PLoS One*, 10 e0128151.
- 30 Barbara Savoldo Donald R. Shaffer, Zhongzhen Yi, Kevin K. H. Chow, Sunitha Kakarla, David M. Spencer, Gianpietro Dotti, Meng-FenWu, Hao Liu, Shannon Kenney, Stephen Gottschalk, (2011), 'T Cells Redirected against Cd70 for the Immunotherapy of Cd70-Positive Malignancies'. *Blood*.
- 31 G. M. Giordano Attianese et al., (2011), 'In Vitro and in Vivo Model of a Novel Immunotherapy Approach for Chronic Lymphocytic Leukemia by Anti-Cd23 Chimeric Antigen Receptor'. *Blood*, 117 4736-45.
- 32 Y. Zhao et al., (2009), 'A Herceptin-Based Chimeric Antigen Receptor with Modified Signaling Domains Leads to Enhanced Survival of Transduced T Lymphocytes and Antitumor Activity'. *J Immunol*, 183 5563-74.
- 33 C. Imai et al., (2004), 'Chimeric Receptors with 4-1bb Signaling Capacity Provoke Potent Cytotoxicity against Acute Lymphoblastic Leukemia'. *Leukemia*, 18 676-84.
- 34 D. G. Song et al., (2012), 'Cd27 Costimulation Augments the Survival and Antitumor Activity of Redirected Human T Cells in Vivo'. *Blood*, 119 696-706.
- 35 M. A. Pule et al., (2005), 'A Chimeric T Cell Antigen Receptor That Augments Cytokine Release and Supports Clonal Expansion of Primary Human T Cells'. *Mol Ther*, 12 933-41.
- 36 R. D. Guest et al., (2005), 'The Role of Extracellular Spacer Regions in the Optimal Design of Chimeric Immune Receptors: Evaluation of Four Different Scfvs and Antigens'. *J Immunother*, 28 203-11.
- 37 S. Wilkie et al., (2008), 'Retargeting of Human T Cells to Tumor-Associated Muc1: The Evolution of a Chimeric Antigen Receptor'. *The Journal of Immunology*, 180 4901-09.
- 38 A. A. Hombach et al., (2010), 'Adoptive Immunotherapy with Genetically Engineered T Cells: Modification of the IgG1 Fc 'Spacer' Domain in the Extracellular Moiety of Chimeric Antigen Receptors Avoids 'Off-Target' Activation and Unintended Initiation of an Innate Immune Response'. *Gene Therapy*, 17 1206-13.
- 39 H. Almasbak et al., (2015), 'Inclusion of an IgG1-Fc Spacer Abrogates Efficacy of Cd19 Car T Cells in a Xenograft Mouse Model'. *Gene Ther*, 22 391-403.

- 40 Michael Hudecek et al., (2015), 'The Nonsignaling Extracellular Spacer Domain of Chimeric Antigen Receptors Is Decisive for in Vivo Antitumor Activity'. *Cancer Immunology Research*, 3 125-35.
- 41 L. J. Cooper et al., (2004), 'Development and Application of Cd19-Specific T Cells for Adoptive Immunotherapy of B Cell Malignancies'. *Blood Cells Mol Dis*, 33 83-9.
- 42 M. C. Jensen et al., (2003), 'Engineered Cd20-Specific Primary Human Cytotoxic T Lymphocytes for Targeting B-Cell Malignancy'. *Cytotherapy*, 5 131-8.
- 43 A. A. Cardoso et al., (1996), 'Pre-B Acute Lymphoblastic Leukemia Cells May Induce T-Cell Anergy to Alloantigen'. *Blood*, 88 41-8.
- 44 M. M. Bartik et al., (1998), 'Impairments in Immune Cell Function in B Cell Chronic Lymphocytic Leukemia'. *Semin Oncol*, 25 27-33.
- 45 H. M. Finney et al., (2003), 'Activation of Resting Human Primary T Cells with Chimeric Receptors: Costimulation from Cd28, Inducible Costimulator, Cd134, and Cd137 in Series with Signals from the Tcr Chain'. *The Journal of Immunology*, 172 104-13.
- 46 T. Brocker et al., (1995), 'Signals through T Cell Receptor-Zeta Chain Alone Are Insufficient to Prime Resting T Lymphocytes'. *J Exp Med*, 181 1653-9.
- 47 E. Yvon et al., (2009), 'Immunotherapy of Metastatic Melanoma Using Genetically Engineered Gd2-Specific T Cells'. *Clin Cancer Res*, 15 5852-60.
- 48 J. Wang et al., (2007), 'Optimizing Adoptive Polyclonal T Cell Immunotherapy of Lymphomas, Using a Chimeric T Cell Receptor Possessing Cd28 and Cd137 Costimulatory Domains'. *Hum Gene Ther*, 18 712-25.
- 49 M. C. Milone et al., (2009), 'Chimeric Receptors Containing Cd137 Signal Transduction Domains Mediate Enhanced Survival of T Cells and Increased Antileukemic Efficacy in Vivo'. *Mol Ther*, 17 1453-64.
- 50 A. Krause et al., (1998), 'Antigen-Dependent Cd28 Signaling Selectively Enhances Survival and Proliferation in Genetically Modified Activated Human Primary T Lymphocytes'. *J Exp Med*, 188 619-26.
- 51 R. J. Brentjens et al., (2007), 'Genetically Targeted T Cells Eradicate Systemic Acute Lymphoblastic Leukemia Xenografts'. *Clin Cancer Res*, 13 5426-35.
- 52 L. G. Radvanyi et al., (1996), 'Cd28 Costimulation Inhibits Tcr-Induced Apoptosis During a Primary T Cell Response'. *The Journal of Immunology*, 156 1788-98.
- 53 C. M. Kowolik et al., (2006), 'Cd28 Costimulation Provided through a Cd19-Specific Chimeric Antigen Receptor Enhances in Vivo Persistence and Antitumor Efficacy of Adoptively Transferred T Cells'. *Cancer Res*, 66 10995-1004.
- 54 B. Savoldo et al., (2011), 'Cd28 Costimulation Improves Expansion and Persistence of Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells in Lymphoma Patients'. *The Journal of Clinical Investigation*, 121 1822-6.
- 55 S. J. van der Stegen et al., (2015), 'The Pharmacology of Second-Generation Chimeric Antigen Receptors'. *Nat Rev Drug Discov*, 14 499-509.
- 56 M. Condomines et al., (2015), 'Tumor-Targeted Human T Cells Expressing Cd28-Based Chimeric Antigen Receptors Circumvent Ctla-4 Inhibition'. *PLoS One*, 10 e0130518.
- 57 Adrienne H. Long et al., (2015), '4-1bb Costimulation Ameliorates T Cell Exhaustion Induced by Tonic Signaling of Chimeric Antigen Receptors'. *Nat Med*, 21 581-90.
- 58 D. G. Song et al., (2011), 'In Vivo Persistence, Tumor Localization, and Antitumor Activity of Car-Engineered T Cells Is Enhanced by Costimulatory Signaling through Cd137 (4-1bb)'. *Cancer Res*, 71 4617-27.
- 59 De-Gang Song et al., (2014), 'Pro-Survival Signaling Via Cd27 Costimulation Drives Effective Car T-Cell Therapy'. *Oncol Immunology*, 1 547-49.
- 60 E. Wang et al., (2015), 'Generation of Potent T-Cell Immunotherapy for Cancer Using Dap12-Based, Multichain, Chimeric Immunoreceptors'. *Cancer Immunology Research*, 3 815-26.

- 61 A. A. Hombach et al., (2011), 'Costimulation by Chimeric Antigen Receptors Revisited the T Cell Antitumor Response Benefits from Combined Cd28-Ox40 Signalling'. *International Journal of Cancer*, 129 2935-44.
- 62 Chan-Juan Shen et al., (2013), 'Chimeric Antigen Receptor Containing Icos Signaling Domain Mediates Specific and Efficient Antitumor Effect of T Cells against Egfrviii Expressing Glioma'. *Journal of Hematology & Oncology*, 6 33-33.
- 63 M. E. Dudley et al., (2008), 'Adoptive Cell Therapy for Patients with Metastatic Melanoma: Evaluation of Intensive Myeloablative Chemoradiation Preparative Regimens'. *J Clin Oncol*, 26 5233-9.
- 64 J. C. Lee et al., (2011), 'In Vivo Inhibition of Human Cd19-Targeted Effector T Cells by Natural T Regulatory Cells in a Xenotransplant Murine Model of B Cell Malignancy'. *Cancer Res*, 71 2871-81.
- 65 L. Gattinoni et al., (2005), 'Removal of Homeostatic Cytokine Sinks by Lymphodepletion Enhances the Efficacy of Adoptively Transferred Tumor-Specific Cd8+ T Cells'. *J Exp Med*, 202 907-12.
- 66 R. J. Brentjens et al., (2011), 'Safety and Persistence of Adoptively Transferred Autologous Cd19-Targeted T Cells in Patients with Relapsed or Chemotherapy Refractory B-Cell Leukemias'. *Blood*, 118 4817-28.
- 67 J. N. Kochenderfer et al., (2012), 'B-Cell Depletion and Remissions of Malignancy Along with Cytokine-Associated Toxicity in a Clinical Trial of Anti-Cd19 Chimeric-Antigen-Receptor-Transduced T Cells'. *Blood*, 119 2709-20.
- 68 Renier Brentjens et al., (2013), 'Cd19-Targeted T Cells Rapidly Induce Molecular Remissions in Adults with Chemotherapy-Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia'. *Science translational medicine*, 5 177ra38-77ra38.
- 69 T. Zhang et al., (2015), 'Efficiency of Cd19 Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells for Treatment of B Cell Malignancies in Phase I Clinical Trials: A Meta-Analysis'. *Oncotarget*, 6 33961-71.
- 70 S. K. Perna et al., (2014), 'Interleukin-7 Mediates Selective Expansion of Tumor-Redirected Cytotoxic T Lymphocytes (CtIs) without Enhancement of Regulatory T-Cell Inhibition'. *Clin Cancer Res*, 20 131-9.
- 71 T. Gargett et al., (2015), 'Different Cytokine and Stimulation Conditions Influence the Expansion and Immune Phenotype of Third-Generation Chimeric Antigen Receptor T Cells Specific for Tumor Antigen Gd2'. *Cytotherapy*, 17 487-95.
- 72 Y. Xu et al., (2014), 'Closely Related T-Memory Stem Cells Correlate with in Vivo Expansion of Car.Cd19-T Cells and Are Preserved by Il-7 and Il-15'. *Blood*, 123 3750-9.
- 73 J. A. Figueroa et al., (2015), 'Chimeric Antigen Receptor Engineering: A Right Step in the Evolution of Adoptive Cellular Immunotherapy'. *Int Rev Immunol*, 34 154-87.
- 74 C. Krug et al., (2014), 'A Gmp-Compliant Protocol to Expand and Transfect Cancer Patient T Cells with Mrna Encoding a Tumor-Specific Chimeric Antigen Receptor'. *Cancer Immunol Immunother*, 63 999-1008.
- 75 S. Ramanayake et al., (2015), 'Low-Cost Generation of Good Manufacturing Practice-Grade Cd19-Specific Chimeric Antigen Receptor-Expressing T Cells Using Piggybac Gene Transfer and Patient-Derived Materials'. *Cytotherapy*, 17 1251-67.
- 76 T. Wicker et al., (2007), 'A Unified Classification System for Eukaryotic Transposable Elements'. *Nat Rev Genet*, 8 973-82.
- 77 S. Gill et al., (2013), 'T Cell-Based Gene Therapy of Cancer'. *Transl Res*, 161 365-79.
- 78 D. Chinnasamy et al., (2000), 'Lentiviral-Mediated Gene Transfer into Human Lymphocytes: Role of Hiv-1 Accessory Proteins'. *Blood*, 96 1309-16.
- 79 Manuri PR Singh H, Olivares S, Dara N, Dawson MJ, Huls H, Hackett PB, Kohn DB, Shpall EJ, Champlin RE, Cooper LJ, (2008), 'Redirecting Specificity of T-Cell Populations for Cd19 Using the Sleeping Beauty System'. *Cancer Res*.



- 80 Food and Drug Administration, 'Testing for Replication Competent Retrovirus (Rcr)/Lentivirus (Rcl) in Retroviral and Lentiviral Vector Based Gene Therapy Products — Revisiting Current Fda Recommendations', ed. by U.S. Department of Health and Human Services (U.S. Food and Drug Administration: Food and Drug Administration, 2015).
- 81 K. Breckpot et al., (2010), 'Hiv-1 Lentiviral Vector Immunogenicity Is Mediated by Toll-Like Receptor 3 (Tlr3) and Tlr7'. *J Virol*, 84 5627-36.
- 82 O. Gresch et al., (2004), 'New Non-Viral Method for Gene Transfer into Primary Cells'. *Methods*, 33 151-63.
- 83 H. Singh et al., (2014), 'A New Approach to Gene Therapy Using Sleeping Beauty to Genetically Modify Clinical-Grade T Cells to Target Cd19'. *Immunol Rev*, 257 181-90.
- 84 Yozo Nakazawa et al., (2009), 'Optimization of the Piggybac Transposon System for the Sustained Genetic Modification of Human T Lymphocytes'. *Journal of Immunotherapy*, 32 826-36.
- 85 Daniel L. Galvan et al., (2009), 'Genome-Wide Mapping of Piggybac Transposon Integrations in Primary Human T Cells'. *Journal of Immunotherapy*, 32 837-44.
- 86 C. S. Hackett et al., (2007), 'Predicting Preferential DNA Vector Insertion Sites: Implications for Functional Genomics and Gene Therapy'. *Genome Biol*, 8 Suppl 1 S12.
- 87 J. C. Fratantoni et al., (2003), 'A Non-Viral Gene Delivery System Designed for Clinical Use'. *Cytotherapy*, 5 208-10.
- 88 M. Kalaitidou et al., (2015), 'Car T-Cell Therapy: Toxicity and the Relevance of Preclinical Models'. *Immunotherapy*, 7 487-97.
- 89 Y. Zhao et al., (2006), 'High-Efficiency Transfection of Primary Human and Mouse T Lymphocytes Using Rna Electroporation'. *Mol Ther*, 13 151-9.
- 90 Y. Zhao et al., (2010), 'Multiple Injections of Electroporated Autologous T Cells Expressing a Chimeric Antigen Receptor Mediate Regression of Human Disseminated Tumor'. *Cancer Res*, 70 9053-61.
- 91 B. Tumaini et al., (2013), 'Simplified Process for the Production of Anti-Cd19-Car-Engineered T Cells'. *Cytotherapy*, 15 1406-15.
- 92 Usanarat Anurathapan et al., (2014), 'Engineered T Cells for Cancer Treatment'. *Cytotherapy*, 16 713-33.
- 93 Eleanor J. Cheadle et al., (2015), 'Car T Cells: Driving the Road from the Laboratory to the Clinic'. *Immunological Reviews*, 257 91-106.
- 94 Food and Drug Administration, 'Content and Review of Chemistry, Manufacturing, and Control (Cmc) Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications (Inds)', ed. by U.S. Department of Health and Human Services (U.S. Food and Drug Administration: Food and Drug Administration, 2008).
- 95 European Medicines Agency, 'Guideline on Human Cell-Based Medicinal Products', ed. by European Medicines Agency (European Medicines Agency 2007).
- 96 Food and Drug Administration, 'Pyrogen and Endotoxins Testing: Questions and Answers', ed. by U.S. Department of Health and Human Services (Food and Drug Administration: Food and Drug Administration, 2012).
- 97 M. Moeller et al., (2005), 'Adoptive Transfer of Gene-Engineered Cd4+ Helper T Cells Induces Potent Primary and Secondary Tumor Rejection'. *Blood*, 106 2995-3003.
- 98 W. K. Chan et al., (2015), 'Chimeric Antigen Receptor-Redirected Cd45ra-Negative T Cells Have Potent Antileukemia and Pathogen Memory Response without Graft-Versus-Host Activity'. *Leukemia*, 29 387-95.
- 99 Jenny Hendriks et al., (2003), 'Cd27 Promotes Survival of Activated T Cells and Complements Cd28 in Generation and Establishment of the Effector T Cell Pool'. *The Journal of Experimental Medicine*, 198 1369-80.
- 100 S. A. Rosenberg et al., (2011), 'Durable Complete Responses in Heavily Pretreated Patients with Metastatic Melanoma Using T-Cell Transfer Immunotherapy'. *Clin Cancer Res*, 17 4550-7.

- 101 N. Cieri et al., (2013), 'Il-7 and Il-15 Instruct the Generation of Human Memory Stem T Cells from Naive Precursors'. *Blood*, 121 573-84.
- 102 S. N. Maiti et al., (2013), 'Sleeping Beauty System to Redirect T-Cell Specificity for Human Applications'. *J Immunother*, 36 112-23.
- 103 C. H. Lamers et al., (2013), 'Long-Term Stability of T-Cell Activation and Transduction Components Critical to the Processing of Clinical Batches of Gene-Engineered T Cells'. *Cytotherapy*, 15 620-6.
- 104 S. R. Riddell et al., (1990), 'The Use of Anti-Cd3 and Anti-Cd28 Monoclonal Antibodies to Clone and Expand Human Antigen-Specific T Cells'. *J Immunol Methods*, 128 189-201.
- 105 D. M. Barrett et al., (2014), 'Relation of Clinical Culture Method to T-Cell Memory Status and Efficacy in Xenograft Models of Adoptive Immunotherapy'. *Cytotherapy*, 16 619-30.
- 106 L. Gattinoni et al., (2005), 'Acquisition of Full Effector Function in Vitro Paradoxically Impairs the in Vivo Antitumor Efficacy of Adoptively Transferred Cd8+ T Cells'. *J Clin Invest*, 115 1616-26.
- 107 Carolina Berger et al., (2008), 'Adoptive Transfer of Effector Cd8(+) T Cells Derived from Central Memory Cells Establishes Persistent T Cell Memory in Primates'. *The Journal of Clinical Investigation*, 118 294-305.
- 108 Y. M. Mueller et al., (2003), 'Il-15 Enhances the Function and Inhibits Cd95/Fas-Induced Apoptosis of Human Cd4+ and Cd8+ Effector-Memory T Cells'. *Int Immunol*, 15 49-58.
- 109 P. Neeson et al., (2010), 'Ex Vivo Culture of Chimeric Antigen Receptor T Cells Generates Functional Cd8+ T Cells with Effector and Central Memory-Like Phenotype'. *Gene Therapy*, 17 1105-16.
- 110 Bob Sinclair, 'To Bead or Not to Bead: Applications of Magnetic Bead Technology', The Scientist, (1998) <<http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/18984/title/To-Bead-or-Not-To-Bead--Applications-of-Magnetic-Bead-Technology/>> [Accessed 02-03-2016 2016].
- 111 J. D. Suerth et al., (2012), 'Genetic Modification of Lymphocytes by Retrovirus-Based Vectors'. *Curr Opin Immunol*, 24 598-608.
- 112 M. O. Butler et al., (2007), 'Long-Lived Antitumor Cd8+ Lymphocytes for Adoptive Therapy Generated Using an Artificial Antigen-Presenting Cell'. *Clin Cancer Res*, 13 1857-67.
- 113 V. Hoyos et al., (2010), 'Engineering Cd19-Specific T Lymphocytes with Interleukin-15 and a Suicide Gene to Enhance Their Anti-Lymphoma/Leukemia Effects and Safety'. *Leukemia*, 24 1160-70.
- 114 James N Kochenderfer et al., (2013), 'Donor-Derived Cd19-Targeted T Cells Cause Regression of Malignancy Persisting after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation'. *Blood*, 122 4129-39.
- 115 H. Singh et al., (2013), 'Manufacture of Clinical-Grade Cd19-Specific T Cells Stably Expressing Chimeric Antigen Receptor Using Sleeping Beauty System and Artificial Antigen Presenting Cells'. *PLoS One*, 8 e64138.
- 116 T. Numbenjapon et al., (2006), 'Characterization of an Artificial Antigen-Presenting Cell to Propagate Cytolytic Cd19-Specific T Cells'. *Leukemia*, 20 1889-92.
- 117 E. Q. Han et al., (2013), 'Chimeric Antigen Receptor-Engineered T Cells for Cancer Immunotherapy: Progress and Challenges'. *Journal of Hematology & Oncology*, 6 47.
- 118 C. R. Cruz et al., (2013), 'Infusion of Donor-Derived Cd19-Redirected Virus-Specific T Cells for B-Cell Malignancies Relapsed after Allogeneic Stem Cell Transplant: A Phase 1 Study'. *Blood*, 122 2965-73.
- 119 Terry J Fry, 'Anti-Cd19 White Blood Cells for Children and Young Adults with B Cell Leukemia or Lymphoma', in *NCT01593696*, ed. by National Institutes of Health Clinical Center (CC) (Maryland, United States: National Cancer Institute (NCI), 2016).
- 120 C. Krug et al., (2015), 'Stability and Activity of Mcsp-Specific Chimeric Antigen Receptors (Cars) Depend on the Scfv Antigen-Binding Domain and the Protein Backbone'. *Cancer Immunol Immunother*, 64 1623-35.

- 121 D. M. Barrett et al., (2014), 'Chimeric Antigen Receptor Therapy for Cancer'. *Annu Rev Med*, 65 333-47.
- 122 M. L. Davila et al., (2014), 'Efficacy and Toxicity Management of 19-28z Car T Cell Therapy in B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia'. *Sci Transl Med*, 6 224ra25.
- 123 James N. Kochenderfer et al., (2013), 'Treating B-Cell Cancer with T Cells Expressing Anti-Cd19 Chimeric Antigen Receptors'. *Nat Rev Clin Oncol*, 10 267-76.
- 124 Daniel W. Lee et al., (2015), 'T Cells Expressing Cd19 Chimeric Antigen Receptors for Acute Lymphoblastic Leukaemia in Children and Young Adults: A Phase 1 Dose-Escalation Trial'. *The Lancet*, 385 517-28.
- 125 R. A. Morgan et al., (2010), 'Case Report of a Serious Adverse Event Following the Administration of T Cells Transduced with a Chimeric Antigen Receptor Recognizing ErbB2'. *Mol Ther*, 18 843-51.
- 126 M. Kalos et al., (2011), 'T Cells with Chimeric Antigen Receptors Have Potent Antitumor Effects and Can Establish Memory in Patients with Advanced Leukemia'. *Sci Transl Med*, 3 95ra73.
- 127 L. M. Whilding et al., (2015), 'Car T-Cell Immunotherapy: The Path from the by-Road to the Freeway?'. *Mol Oncol*, 9 1994-2018.
- 128 Perry B. Hackett et al., (2013), 'Evaluating Risks of Insertional Mutagenesis by DNA Transposons in Gene Therapy'. *Translational Research*, 161 265-83.
- 129 D. Zychlinski et al., (2008), 'Physiological Promoters Reduce the Genotoxic Risk of Integrating Gene Vectors'. *Mol Ther*, 16 718-25.
- 130 G. Maruggi et al., (2009), 'Transcriptional Enhancers Induce Insertional Gene Deregulation Independently from the Vector Type and Design'. *Mol Ther*, 17 851-6.
- 131 S. Stein et al., (2010), 'Genomic Instability and Myelodysplasia with Monosomy 7 Consequent to Evi1 Activation after Gene Therapy for Chronic Granulomatous Disease'. *Nat Med*, 16 198-204.
- 132 S. J. Howe et al., (2008), 'Insertional Mutagenesis Combined with Acquired Somatic Mutations Causes Leukemogenesis Following Gene Therapy of Scid-X1 Patients'. *J Clin Invest*, 118 3143-50.
- 133 Sebastian Newrzela et al., (2008), 'Resistance of Mature T Cells to Oncogene Transformation'. *Blood*, 112 2278-86.
- 134 C. H. June et al., (2009), 'Engineering Lymphocyte Subsets: Tools, Trials and Tribulations'. *Nat Rev Immunol*, 9 704-16.
- 135 F. Ciceri et al., (2009), 'Infusion of Suicide-Gene-Engineered Donor Lymphocytes after Family Haploidentical Haemopoietic Stem-Cell Transplantation for Leukaemia (the Tk007 Trial): A Non-Randomised Phase I-II Study'. *Lancet Oncol*, 10 489-500.
- 136 C. Bonini et al., (2003), 'Safety of Retroviral Gene Marking with a Truncated Ngf Receptor'. *Nat Med*, 9 367-69.
- 137 Alessandra Recchia et al., (2006), 'Retroviral Vector Integration Deregulates Gene Expression but Has No Consequence on the Biology and Function of Transplanted T Cells'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 1457-62.
- 138 J. Scholler et al., (2012), 'Decade-Long Safety and Function of Retroviral-Modified Chimeric Antigen Receptor T Cells'. *Sci Transl Med*, 4 132ra53.
- 139 Siok-Keen Tey, (2014), 'Adoptive T-Cell Therapy: Adverse Events and Safety Switches'. *Clin Trans Immunol*, 3 e17.
- 140 A. M. Geurts et al., (2003), 'Gene Transfer into Genomes of Human Cells by the Sleeping Beauty Transposon System'. *Mol Ther*, 8 108-17.
- 141 Matthew H. Wilson Pallavi V. Raja Manuri, Sourindra N. Maiti, Tiejuan Mi, Harjeet Singh, Simon Olivares, Margaret J. Dawson, Helen Huls, Dean A. Lee, Pulivarthi H. Rao, Joseph M. Kaminski, Yozo Nakazawa, Stephen Gottschalk, Partow Kebriaei, Elizabeth J. Shpall, Richard E. Champlin, and Laurence J.N. Cooper, (2010), 'Piggybac

- Transposon=Transposase System to Generate Cd19-Specific T Cells for the Treatment of B-Lineage Malignancies'. *Human Gene Therapy*.
- 142 X. J. Xu et al., (2014), 'Cytokine Release Syndrome in Cancer Immunotherapy with  
Chimeric Antigen Receptor Engineered T Cells'. *Cancer Letters*, 343 172-8.
- 143 Shannon L. Maude et al., (2014), 'Chimeric Antigen Receptor T Cells for Sustained  
Remissions in Leukemia'. *New England Journal of Medicine*, 371 1507-17.
- 144 D. L. Porter et al., (2015), 'Chimeric Antigen Receptor T Cells Persist and Induce Sustained  
Remissions in Relapsed Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia'. *Sci Transl Med*, 7  
303ra139.
- 145 R. Brentjens et al., (2010), 'Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia with Genetically  
Targeted Autologous T Cells: Case Report of an Unforeseen Adverse Event in a Phase I  
Clinical Trial'. *Mol Ther*, 18 666-8.
- 146 M. L. Davila et al., (2014), 'Chimeric Antigen Receptors for the Adoptive T Cell Therapy of  
Hematologic Malignancies'. *Int J Hematol*, 99 361-71.
- 147 M. Casucci et al., (2015), 'Overcoming the Toxicity Hurdles of Genetically Targeted T Cells'.  
*Cancer Immunol Immunother*, 64 123-30.
- 148 Stephan A. Grupp et al., (2013), 'Chimeric Antigen Receptor–Modified T Cells for Acute  
Lymphoid Leukemia'. *New England Journal of Medicine*, 368 1509-18.
- 149 H. C. Ertl et al., (2011), 'Considerations for the Clinical Application of Chimeric Antigen  
Receptor T Cells: Observations from a Recombinant DNA Advisory Committee Symposium  
Held June 15, 2010'. *Cancer Res*, 71 3175-81.
- 150 F. L. Ferreira et al., (2001), 'Serial Evaluation of the Sofa Score to Predict Outcome in  
Critically Ill Patients'. *Jama*, 286 1754-8.
- 151 D. T. Teachey et al., (2013), 'Cytokine Release Syndrome after Blinatumomab Treatment  
Related to Abnormal Macrophage Activation and Ameliorated with Cytokine-Directed  
Therapy'. *Blood*, 121 5154-7.
- 152 D. M. Barrett et al., (2014), 'Toxicity Management for Patients Receiving Novel T-Cell  
Engaging Therapies'. *Curr Opin Pediatr*, 26 43-9.
- 153 S. L. Maude et al., (2014), 'Managing Cytokine Release Syndrome Associated with Novel T  
Cell-Engaging Therapies'. *Cancer J*, 20 119-22.
- 154 Michaela Sharpe et al., (2015), 'Genetically Modified T Cells in Cancer Therapy:  
Opportunities and Challenges'. *Disease Models and Mechanisms*, 8 337-50.
- 155 D. L. Porter et al., (2011), 'Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells in Chronic  
Lymphoid Leukemia'. *N Engl J Med*, 365 725-33.
- 156 James N. Kochenderfer et al., (2015), 'Chemotherapy-Refractory Diffuse Large B-Cell  
Lymphoma and Indolent B-Cell Malignancies Can Be Effectively Treated with Autologous T  
Cells Expressing an Anti-Cd19 Chimeric Antigen Receptor'. *Journal of Clinical Oncology*, 33  
540-9.
- 157 F. M. Uckun et al., (1988), 'Detailed Studies on Expression and Function of Cd19 Surface  
Determinant by Using B43 Monoclonal Antibody and the Clinical Potential of Anti-Cd19  
Immunotoxins'. *Blood*, 71 13-29.
- 158 Jacqueline Corrigan-Curay et al., (2014), 'T-Cell Immunotherapy: Looking Forward'. *Mol  
Ther*, 22 1564-74.
- 159 C. H. Lamers et al., (2013), 'Treatment of Metastatic Renal Cell Carcinoma with Caix Car-  
Engineered T Cells: Clinical Evaluation and Management of on-Target Toxicity'. *Mol Ther*,  
21 904-12.
- 160 Marcela V. Maus et al., (2013), 'T Cells Expressing Chimeric Antigen Receptors Can Cause  
Anaphylaxis in Humans'. *Cancer immunology research*, 1 26-31.
- 161 De-Gang Song et al., (2015), 'A Fully Human Chimeric Antigen Receptor with Potent  
Activity against Cancer Cells but Reduced Risk for Off-Tumor Toxicity'. *Oncotarget*, 6  
21533-46.

- 162 Michael H. Kershaw et al., (2006), 'A Phase I Study on Adoptive Immunotherapy Using Gene-Modified T Cells for Ovarian Cancer'. *Clinical Cancer Research*, 12 6106-15.
- 163 E. Lanitis et al., (2012), 'Redirected Antitumor Activity of Primary Human Lymphocytes Transduced with a Fully Human Anti-Mesothelin Chimeric Receptor'. *Mol Ther*, 20 633-43.
- 164 Donald B. Kohn et al., (2011), 'Cars on Track in the Clinic'. *Mol Ther*, 19 432-38.
- 165 J. A. Klapper et al., (2009), 'Single-Pass, Closed-System Rapid Expansion of Lymphocyte Cultures for Adoptive Cell Therapy'. *J Immunol Methods*, 345 90-9.
- 166 C. L. Lorentzen et al., (2015), 'Cd19-Chimeric Antigen Receptor T Cells for Treatment of Chronic Lymphocytic Leukaemia and Acute Lymphoblastic Leukaemia'. *Scand J Immunol*, 82 307-19.
- 167 J. C. Riches et al., (2013), 'Understanding the Immunodeficiency in Chronic Lymphocytic Leukemia: Potential Clinical Implications'. *Hematol Oncol Clin North Am*, 27 207-35.
- 168 Eric Althoff, 'Novartis Highlights New Ctl019 Phase II Data Demonstrating 93% Complete Remission in Pediatric Patients with R/R ALL', ed. by Novartis International AG (Basel, Switzerland: Novartis Global Communications, 2016).
- 169 N. Masir et al., (2006), 'Loss of Cd19 Expression in B-Cell Neoplasms'. *Histopathology*, 48 239-46.
- 170 Alexandra S. Onea et al., (2016), 'Cd19 Chimeric Antigen Receptor (Cd19 Car)-Redirected Adoptive T-Cell Immunotherapy for the Treatment of Relapsed or Refractory B-Cell Non-Hodgkin's Lymphomas'. *American Journal of Cancer Research*, 6 403-24.
- 171 Wen-ying Zhang et al., (2016), 'Treatment of Cd20-Directed Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells in Patients with Relapsed or Refractory B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma: An Early Phase I/II Trial Report'. *Signal Transduction And Targeted Therapy*, 1 16002.
- 172 Helen E Heslop, 'Phase I Study of the Administration of Ebv Ctl's Expressing Cd30 Chimeric Receptors for Relapsed Cd30+ Hodgkin's Lymphoma and Cd30+ Non-Hodgkin's Lymphoma (Car Cd 30)', in *NCT01192464*, ed. by Baylor College of Medicine (Houston, Texas, United States: Baylor College of Medicine, 2016).
- 173 Carlos Ramos, 'Phase I Study of the Administration of T Lymphocytes Expressing the Cd30 Chimeric Antigen Receptor for Relapsed Cd30+ Hodgkin's Lymphoma and Cd30+ Non-Hodgkin's Lymphoma (Cart Cd30)', in *NCT01316146* (Houston, Texas, United States: UNC Lineberger Comprehensive Cancer Center, 2016).
- 174 Jun Zhu, 'Safety and Efficacy Evaluation of 4th Generation Safety-Engineered Car T Cells Targeting Relapsed and Refractory Cd30 Positive Lymphomas', in *NCT02274584*, ed. by Peking University (Gainesville, Florida, United States: University of Florida, 2016).
- 175 Thomas Shea, 'Phase I/II Study of the Administration of T Lymphocytes Expressing the Cd30 Chimeric Antigen Receptor (Car) for Relapsed/Refractory Cd30+ Hodgkin's Lymphoma and Cd30+ Non-Hodgkin's Lymphoma', in *NCT02690545*, ed. by UNC Lineberger Comprehensive Cancer Center (Chapel Hill, North Carolina, United States: UNC Lineberger Comprehensive Cancer Center, 2016).
- 176 Thomas Shea, 'Phase I Study of the Administration of T Lymphocytes Expressing the Cd30 Chimeric Antigen Receptor (Car) for Prevention of Relapse of Cd30+ Lymphomas after High Dose Therapy and Autologous Stem Transplantation (Atlas)', in *NCT02663297*, ed. by UNC Lineberger Comprehensive Cancer Center (Chapel Hill, North Carolina, United States: UNC Lineberger Comprehensive Cancer Center, 2016).
- 177 Weidong Han, 'Cd30-Directed Chimeric Antigen Receptor T (Cart30) Therapy in Relapsed and Refractory Cd30 Positive Lymphomas', in *NCT02259556*, ed. by Chinese PLA General Hospital (Beijing, Beijing, China: Chinese PLA General Hospital, 2016).
- 178 P. L. Bergsagel et al., (1995), 'In Multiple Myeloma, Clonotypic B Lymphocytes Are Detectable among Cd19+ Peripheral Blood Cells Expressing Cd38, Cd56, and Monotypic Ig Light Chain'. *Blood*, 85 436-47.
- 179 N. Hosen, (2013), 'Multiple Myeloma-Initiating Cells'. *Int J Hematol*, 97 306-12.

- 180 Scott Wilkie et al., (2012), 'Dual Targeting of Erbb2 and Muc1 in Breast Cancer Using  
Chimeric Antigen Receptors Engineered to Provide Complementary Signaling'. *Journal of  
Clinical Immunology*, 32 1059-70.
- 181 Christopher C. Kloss et al., (2013), 'Combinatorial Antigen Recognition with Balanced  
Signaling Promotes Selective Tumor Eradication by Engineered T Cells'. *Nat Biotech*, 31  
71-75.
- 182 E. Lanitis et al., (2013), 'Chimeric Antigen Receptor T Cells with Dissociated Signaling  
Domains Exhibit Focused Antitumor Activity with Reduced Potential for Toxicity in Vivo'.  
*Cancer Immunology Research*, 1 43-53.
- 183 K. T. Roybal et al., (2016), 'Precision Tumor Recognition by T Cells with Combinatorial  
Antigen-Sensing Circuits'. *Cell*, 164 770-9.
- 184 Non specified, 'Cellular Adoptive Immunotherapy in Treating Patients with Relapsed or  
Refractory Follicular Non-Hodgkin's Lymphoma', in *NCT00182650*, ed. by City of Hope  
Medical Center (California, United States Of America: City of Hope Medical Center, 2008).
- 185 S. Marktel et al., (2003), 'Immunologic Potential of Donor Lymphocytes Expressing a  
Suicide Gene for Early Immune Reconstitution after Hematopoietic T-Cell-Depleted Stem  
Cell Transplantation'. *Blood*, 101 1290-8.
- 186 Antonio Di Stasi et al., (2011), 'Inducible Apoptosis as a Safety Switch for Adoptive Cell  
Therapy'. *New England Journal of Medicine*, 365 1673-83.
- 187 Jun Zhu, 'Safety and Efficacy Evaluation of 4th Generation Safety-Engineered Car T Cells  
Targeting High-Risk and Refractory B Cell Lymphomas', in *NCT02247609*, ed. by Peking  
University (China, Beijing: Peking University, 2014).
- 188 A. Marcus et al., (2011), 'Redirected Tumor-Specific Allogeneic T Cells for Universal  
Treatment of Cancer'. *Blood*, 118 975-83.
- 189 B. Biedron et al., (2014), 'Talen-Mediated Editing of Endogenous T-Cell Receptors  
Facilitates Efficient Reprogramming of T Lymphocytes by Lentiviral Gene Transfer'. *Gene  
Ther*, 21 539-48.
- 190 H. Torikai et al., (2012), 'A Foundation for Universal T-Cell Based Immunotherapy: T Cells  
Engineered to Express a Cd19-Specific Chimeric-Antigen-Receptor and Eliminate  
Expression of Endogenous Tcr'. *Blood*, 119 5697-705.
- 191 M. Themeli et al., (2015), 'New Cell Sources for T Cell Engineering and Adoptive  
Immunotherapy'. *Cell Stem Cell*, 16 357-66.
- 192 J. Valton et al., (2015), 'A Multidrug-Resistant Engineered Car T Cell for Allogeneic  
Combination Immunotherapy'. *Mol Ther*, 23 1507-18.